

遗传 HEREDITAS (Beijing) 21(3):5~8 1999

遗传快报 ·

利用 GFP 示踪细胞内源性 P53 活性检测 DNA 损伤

曾位森²⁾ 夏宁邵¹⁾ 罗琛²⁾ 谢卫兵²⁾

丁亮¹⁾ 黄宗平¹⁾ 曾定¹⁾

(1. 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, 厦门 361005)

(2. 第一军医大学生物与遗传教研室, 广州 510515)

摘要 DNA 损伤的检测对预防癌症和遗传病等非常重要。采用分子克隆技术, 将报告基因—绿色荧光蛋白(GFP)置于 SV40 基本启动子调控下, 构建成对照载体 pSV - GFP。在 SV40 基本启动子上游插入寡核苷酸 P53RE, 构建成示踪载体 p53RE - GFP。转染 NIH 3T3 细胞, 以 GFP 示踪细胞内源性 P53 的转录激活活性。紫外线照射或 H₂O₂ 处理转化细胞使 DNA 损伤, 诱导细胞内源性 P53 的表达。用激光扫描共聚焦成像系统(LSCIS)对细胞进行红、绿、蓝三色光融合成像, 并测定 GFP 经 488nm 激发后发出的绿色荧光光密度, 验证 GFP 示踪 P53 的特异性。p53RE - GFP 转化细胞 3T3 - REG 经紫外线照射或 H₂O₂ 处理后, GFP 的表达增高, 处理后 1hr 光密度即达到最高水平, 随后逐渐降低。血清“饥饿”—非 DNA 损伤处理的 3T3 - REG 细胞, 以及经紫外和 H₂O₂ 处理的对照载体 pSV - GFP 转化细胞 3T3 - SVG, GFP 的表达无明显增强。实验表明: GFP 示踪内源性 P53 转录激活活性用于检测 DNA 损伤有很高的灵敏度和特异性, 适宜推广应用。

关键词 绿色荧光蛋白, P53, DNA 损伤, 检测

中图分类号 Q523, R394 - 3

GFP Reporting Endogenous P53 Transcriptional Activation as a Detector for DNA Damage

ZENG Wei - Sen²⁾ XIA Ning - Shao¹⁾ LUO Chen²⁾ XIE Wei - Bing²⁾

DING Liang¹⁾ HUANG Zong - Ping¹⁾ ZENG Ding¹⁾

(1. State Lab. of Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

(2. Department of Biology and genetics, The First Military Medical College, Guangzhou 510515)

Abstract Identifying and measuring DNA damage are important in hazard assessment. Reporter gene, green fluorescent protein(GFP), with P53 response element(P53RE) fusion gene was constructed and transfected NIH 3T3 cells. Transformed cells were treated with ultraviolet and H₂O₂ to make DNA damage and induce endogenous P53 expression. The GFP expression and the intensity of green fluorescence in cells were measured with Laser Scanning

厦门大学肿瘤细胞工程教育部开放研究实验室资助课题。

曾位森, 男, 31 岁, 助理研究员, 遗传学硕士, 毕业于湖南医科大学, 通讯联系人。E-mail:

zengws@fimmu.edu.cn

Confocal Imaging System (LSCIS). The fluorescence intensity increased rapidly after ultraviolet and H_2O_2 treatment and reached the maximum 1 hr later, then decreased slowly. The fluorescent intensity of cells treated with fetal calf serum (FCS) drawing, a non DNA damage treatment, increased slightly 4hr later, as well as cells transformed with control vector pSV - GFP after ultraviolet treatment. The results suggest that GFP as a reporter of P53 transcriptional activation is a sensitive and specific detector for DNA damage.

Key words GFP, P53, DNA damage, Detection

DNA 损伤是基因突变的前奏,是癌变、畸变的分子基础。许多理化诱变因素大都是先使细胞 DNA 受损,进而诱发基因突变的^[1,2]。然而,DNA 损伤的检测至今尚无完善的检测方法和统一的标准。现有的几种检测方法,如:碱性解旋法,单个细胞凝胶电泳(SCGE)等方法灵敏度都较低,只能检测较严重的 DNA 损伤,而且不易量化^[3]。小的 DNA 损伤或点突变虽可能不引起细胞死亡,但有累积效应和遗传性,会增加生物的遗传负荷,对人类和其他生物形成远期危害。故有必要建立更为灵敏的检测方法。

通过检测 DNA 损伤应激基因(Stress gene) GADD45、p53 等的活性,间接地评判 DNA 损伤是近年来发展起来的新方法。p53 在正常的生理状态下几乎没有活性,当 DNA 受损时活性升高,使细胞停滞在 G₁ 期,利于受损 DNA 修复。而当 DNA 的损伤不可逆时,则启动细胞程序性死亡(PCD)^[4~7]。P53 是一种核内转录调控蛋白,通过反式转录激活方式调控相关基因的转录。P53 羧基端能与特异的 DNA 序列(P53 response element P53RE)结合,而 P53 氨基端则有较强的激活转录功能,可激活 P53RE 下游基因的转录^[6~8]。Todd 等^[9]用氯霉素酰基转移酶(CAT)反映细胞内源性 P53 活性来检测 DNA 损伤,结果灵敏稳定。但 CAT 的检测要用放射性同位素,不够安全,而且费用较高,限制了其推广应用。

绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein GFP)是来源于水母的荧光蛋白,在紫外和蓝光激发后发绿色荧光,作为报告基因已广泛应用于原核和真核细胞,示踪外源基因表达^[10~13]。GFP 是目前唯一能在活体细胞中观察的报告基因。它对细胞无毒性,经乙醇或甲醛等固定后很稳定,荧光不易“淬灭”,可以较长时间保存^[13]。我们构建 P53RE 与 GFP 融合基因真核表达载体,转化 NIH 3T3 细胞,以 GFP 示踪内源性 P53 活性来检测 DNA 损伤。用紫外线和 H_2O_2 处理转化细胞使 DNA 损伤,诱导 P53 表达,通过观测 GFP 的荧光强度变化验证此方法检测 DNA 损伤的特异性和效率。现将结果报告如下:

1 材 料 和 方 法

1.1 材 料

质粒 pGL2 - control (Promega) 含有 SV40 基本启动子和 *luc* 基因。Alpha + GFP - C3 (Maxygene) 含有 GFP 基因和真核强启动子 Alpha。NIH 3T3 细胞株为我室保存。内切酶、工具酶: *Sma*I、*Bgl*I、*Kpn*I (Bio Lab), *Bsp*120 (*Apa*I)、*Xba*I (MBI), Taq 酶、dNTP (Sangon), Klenow Fragment、T4 ligase (Promega)。Lipfectin, DMEM (Life Tech), G418 (Sigma), 胎牛血清(四季青公司)。引物和 P53RE 由中国科学院上海细胞生物研究所合成。上游引物 SP1: 5' AGG GGC CCT GTA ACT GAC TAA C3; 下游引物 SP2: 5' GCT CTA GAG TAC CGG AAT GCC A3, 扩增 PGL2 - control 质粒上多克隆位点和 SV40 启动子序列,在上下游引物中分别设计有 *Bsp*120 和 *Xba*I 酶切位点。P53RE 的设计参照 Kern SE 等^[6]的方案。

RE1: 5' GAT CCT GCC TGG ACT TGC CTG3

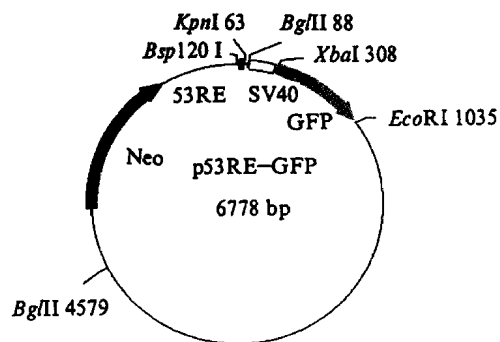
RE2: 3' GA CGG ACC TGA ACG GAC CTA G5

仪器: PTC - 100 热循环仪 (MJ Research Inc), AH2 - RFL 研究用显微镜 (Olympus), 激光扫描共聚焦图象分析系统 (LSCIS) MRC - 1024 (Bio - Rad)。

1.2 载体构建

载体构建方案如图 1 所示。切除 Alpha + GFP 质粒 Alpha 启动子, 接上来源于 pGL2 质粒的 SV40 基本启动子, 构建对照质粒 pSV - GFP。在 pSV - GFP 质粒 SV40 启动子上游插入 P53RE 构建示踪质粒 p53RE - GFP。

1a: p53RE-GFP plasmid



1b: pSV-GFP plasmid

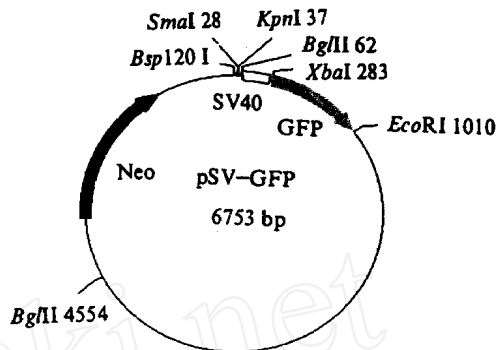


图 1 示踪载体 p53RE - GFP 和对照载体 pSV - GFP 结构示意图

1.3 细胞转染

采用 Lipfectin 转染法。分别用 p53RE - GFP 和 pSV - GFP 质粒转染 3T3 细胞(按照 Lipfectin 说明书)。用终浓度为 1mg/ml G418 筛选二周。将转化有 p53RE - GFP 的细胞命名为 3T3 - REG, 有 pSV - GFP 的细胞命名为 3T3 - SVG。

1.4 评价示踪载体的特异性和效力

1.4.1 紫外线照射 在 35mm 培养皿中放一消毒盖玻片, 将 3T3 - REG 和 3T3 - SVG 分别接种至 5 个培养皿中, 至细胞长满后去盖, 距 40W 消毒紫外灯下 20cm 照射 20min, 分别于 1.0hr、2.0hr、4.0hr、8.0hr、16.0hr 取盖玻片于 75% 酒精中固定 30min。在 LSCIS 上对细胞进行红、蓝、绿三色光融合成像(488nm 激发光), 并测定绿色荧光的光密度。

1.4.2 H₂O₂ 处理细胞 用终浓度为 0.4μg/ml 的 H₂O₂ 处理 3T3 - REG 和 3T3 - SVG 细胞, 在处理 1.0hr、2.0hr、4.0hr、8.0hr、16.0hr 取盖玻片固定, LSCIS 测定荧光光密度。

1.4.3 血清“饥饿”非 DNA 损伤性处理细胞 待细胞长至对数生长期, 吸去原培养基, 加入无血清的 DMEM, 1.0hr、2.0hr、4.0hr、8.0hr、16.0hr 后取盖玻片固定, 测定荧光光密度。

2 结 果 与 讨 论

本实验成功构建了示踪质粒 p53RE - GFP 和对照质粒 pSV - GFP(图 1)。转染 NIH 3T3 细胞, 克隆成相应的示踪细胞 3T3 - REG 和对照细胞 3T3 - REG, 并经限制性酶切和 PCR 鉴定确认。

未经紫外线照射的 3T3 - REG 细胞, 荧光镜下仅能看到很弱的黄绿色本底荧光, 在激光扫描共聚焦显微镜上经红、绿、蓝三色光融合成像, 只有少数细胞的部分区域可见微弱荧光(图版 a), 选取几个代表性细胞测定绿色荧光光密度, 最亮的为 60.46, 平均为 54.8。经紫外线照射后荧光明显增强, 所有细胞均可看见比较强的绿色荧光(图版 b), 荧光的平均亮度在照射后 1hr 最亮, 平均约为 97.55。随后荧光逐渐减弱, 16hr 后, 由于细胞收缩得很小, 荧光的平均光密度反而增高(图 2)。H₂O₂ 处理的细胞 GFP 的荧光亮度表现出与紫外线照射类似的变化, 但平均荧光亮度略强, 1hr 时平均光密度 104.41(图版 c)。而非 DNA 损伤因素——血清“饥饿”处理的细胞, 荧光光密度无明显增加, 仍然只发出本底荧光(图 2)。证明 GFP 的增强表达依赖于 DNA 损伤和 P53 的表达。

对照细胞 3T3 - SVG 处理前也仅能看到很弱的本底荧光, 平均光密度为 54.06, 与 3T3 - REG 细胞相似。经紫外线照射后 1hr, 荧光强度增加至 60.42, 2hr 后为 56.75, 与处理前无明显差别(图 3)。进一步证实 GFP 的增强表达依赖于 P53 通过 P53RE 的转录激活作用。3T3 - REG 细胞经紫外照射和 H_2O_2 处理, 绿色荧光光密度迅速增高, 1hr 即达到最高, 然后逐渐减弱。说明 DNA 损伤后, P53 应激性表达, 反式激活 GFP 基因转录, 随后 P53 很快失活, GFP 的表达也随之降低, 与野生型 P53 半衰期短的报道基本一致^[14]。用 pGL2 质粒上基本启动子 SV40 置换 Alpha + GFP 质粒上强启动子 Alpha, 使细胞本底的 GFP 荧光减弱, 提高示踪 P53 活性的灵敏度。上述实验证明是有效的。

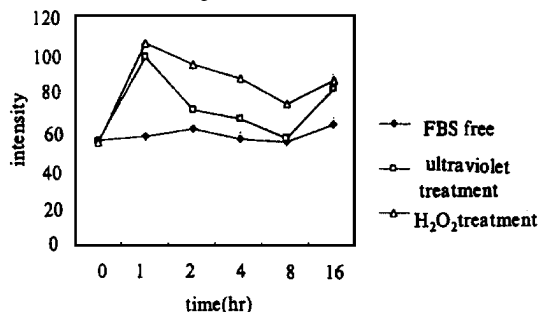


图 2 3T3 REG 细胞在 DNA 损伤因素处理后几个时间点绿色荧光光密度反映的 GFP 表达水平的变化

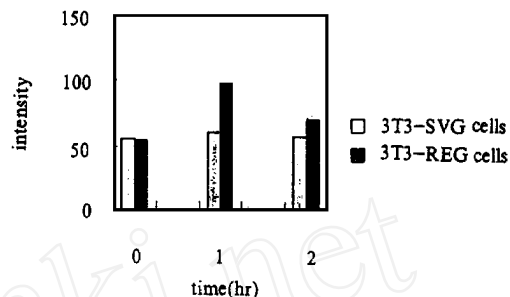


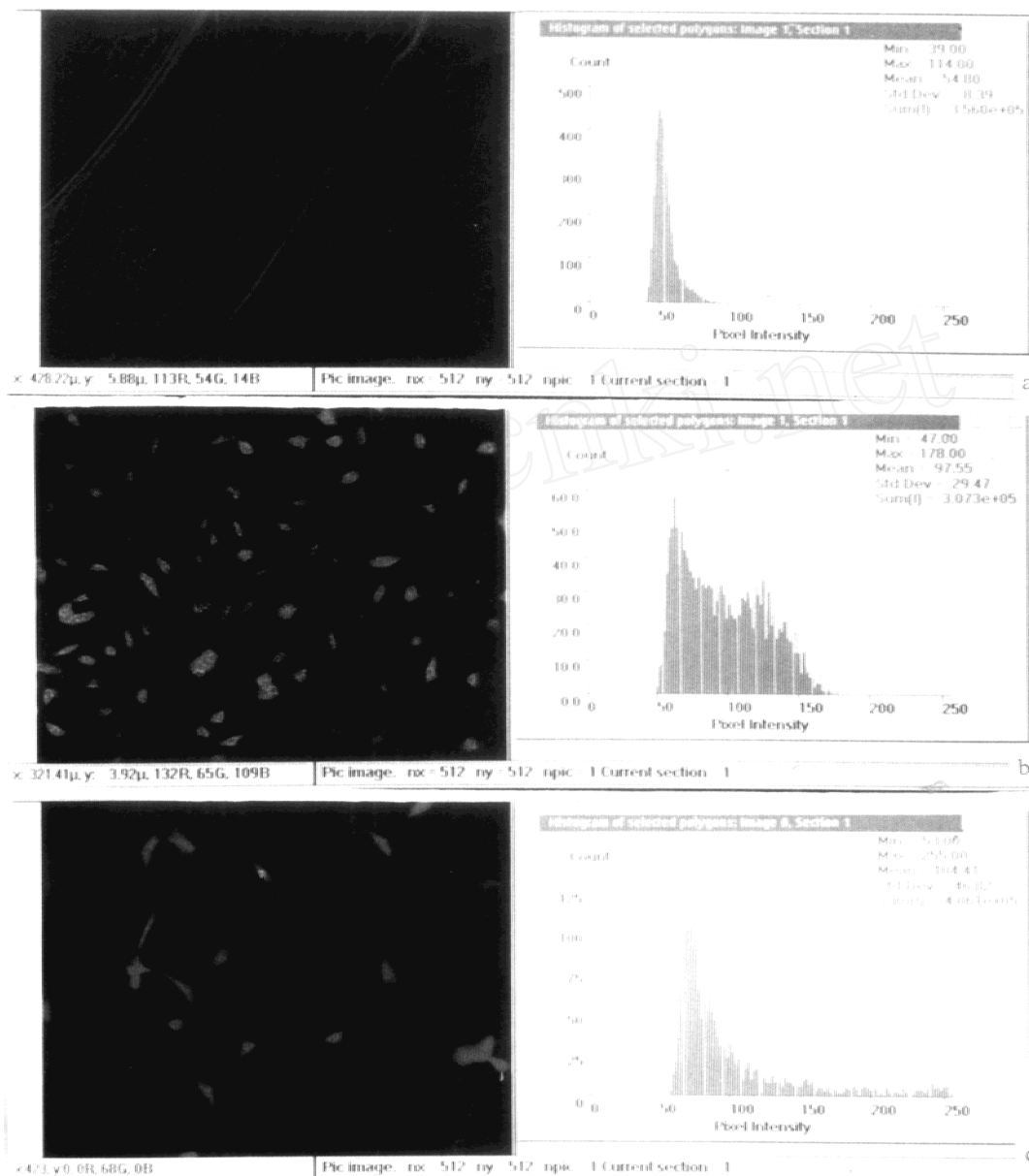
图 3 3T3 REG 与对照细胞 3T3 - SVG 紫外线照射后绿色荧光光密度反映的 GFP 表达水平的比较

与其他几种检测 DNA 损伤的方法相比, 本方法有以下几个优点: 观测快速简便, 灵敏度高, 处理几十分钟内就可检测出结果; 操作安全, 避免接触有毒染料; 在倒置荧光显微镜下可动态实时地观察细胞形态改变和内源性 P53 活性的变化, 没有人为因素干扰, 结果客观可信; 几种应激基因的组合分析, 可探讨 DNA 的损伤及修复机制。本示踪载体可广泛适应于细胞凋亡机理研究, 抗癌药物筛选, DNA 损伤和基因毒性的检测等许多方面。此外, 还可用于评判癌细胞 P53 状态, 以指导临床用药。

参 考 文 献

- 1 Ahnstrom G. Techniques to measure DNA single - strand breaks in cells: a review. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1988, 54: 695 ~ 707
- 2 Sigh N P *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. *Experimenta Cell Research*, 1988, 175: 184 ~ 191
- 3 马爱国, 韩秀霞, 刘四朝等. 两种 DNA 断裂损伤检测方法敏感性的比较. *遗传*, 1997, 19: 32 ~ 34
- 4 陈汉源. P53 蛋白结构和功能. *国外医学遗传学分册*, 1995, 18: 239 ~ 245
- 5 EI - deiry W S, Tokino T, Velculescu V E *et al.* WAF1, a ptential mediator of P53 tumor suppression. *Cell*, 1993, 75: 817 ~ 825
- 6 Kern S E, Pietenpol J A, Thiagalingam S *et al.* Oncogenic form of P53 inhibit P53 - regulated gene expression. *Science*, 1992, 256: 827
- 7 EI - Deiry W S, Harper J M, O Connor P M *et al.* WAF1/ CIP1 is induced in P53 - mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Research*, 1994, 54: 1169 ~ 1176
- 8 Lowe S W *et al.* P53 status and efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*, 1994, 266: 807 ~ 809
- 9 Todd M D, Lee M J, Williams J L *et al.* The CAT - TOX(L) assay: a sensitive and specific measure of stress - induced transcription in transformed human liver cells. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1995, 28: 118 ~ 128
- 10 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W W *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263: 802 ~ 805
- 11 Wang S, Hazelrigg J. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature*, 1994, 369: 400 ~ 403
- 12 Heim R, Cubiff A, Tsien R Y. Improved green fluorescence. *Nature*, 1995, 373: 663 ~ 664
- 13 Cramer A, Whiteborn E A, Tate E *et al.* Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotech.*, 1996, 14: 315 ~ 319
- 14 Fields S and Jang S K. Presence of a potent transcription activating sequence in the P53 protein. *Science*, 1990, 249: 1046 ~ 1049

1998 - 09 - 21 收稿, 1998 - 12 - 30 修稿.



不同处理的转化细胞 3T3-REG 在 LSCIS 上, 经红、绿、蓝三色广融合成像及圈定的数个细胞绿色荧光光密度分布图: a. 未经处理的对照细胞, 红、绿双色成像, 只有部分细胞的部分部位有绿色荧光; b. 紫外线照射后 1hr 的细胞, 红、绿、蓝三色成像, 所有细胞均发出较强的荧光; c. $0.4 \mu\text{g/ml}$ H_2O_2 处理的细胞, 绿色单色光成像, 所有细胞均发出很强的荧光。